

(25)

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報 (A) 昭62-12724

⑫ Int.Cl.
A 61 K 45/02識別記号
ABJ
ADD庁内整理番号
7252-4C

⑬ 公開 昭和62年(1987)1月21日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全13頁)

⑭ 発明の名称 IPN-r 含有医薬組成物

⑮ 特願 昭61-123862

⑯ 出願 昭61(1986)5月30日

⑰ 优先権主張 ② 1985年5月30日 ② 西ドイツ (DE) ② P3519361.1

⑱ 発明者 マインラント ペテル オーストリア国ウイーン、ベルガツセ 25-28
リツク⑲ 発明者 オスカーホフマン オーストリア国ウイーン、ブツヘンガツセ17-19-41
ベーリンガー インゲ ドイツ連邦共和国インゲルハイム アム ライン (番地なし)
ルハイム インターナシヨナルゲゼルシャフ
ト ミット ベシユレ
ンクテルハフツンク

⑳ 代理人 弁理士 浅村 照 外2名

明細書の記載(実質に変更なし)
明細書

1. 発明の名称

IPN-r 含有医薬組成物

2. 特許請求の範囲

- (1) 骨の生成および分解に際して生じる過程を調節する IPN-r 含有医薬組成物
- (2) 炎症または非炎症起原(変性疾患)の全身的または局所的骨疾患治療用の特許請求の範囲第1項記載の医薬組成物
- (3) 病理学的骨喪失の治療用の特許請求の範囲第1項記載の医薬組成物
- (4) 骨組織の局所的または全般的分解によつて生じる骨疾患治療用の特許請求の範囲第1項記載の医薬組成物
- (5) 骨吸収の増大を招く過程を阻害する特許請求の範囲第1項記載の医薬組成物
- (6) 骨におけるプロスタグランジンの内因性合成分泌する特許請求の範囲第1項記載の医薬組成物
- (7) 骨におけるプロスタグランジンの合成にはと

んどまたは全く骨害作用を示さない非ステロイド性抗炎症剤と配合した、プロスタグランジンの内因性合成分泌および骨軟化活性を阻害する特許請求の範囲第1項および第2項のいずれかに記載の医薬組成物

- (8) 骨細胞活性を阻害する特許請求の範囲第1項記載の医薬組成物
- (9) パラソルモンによつて生じるすべての骨異常症、とくに骨性の骨疾患の治療用の特許請求の範囲第1項記載の医薬組成物
- (10) パラソルモン誘発骨吸収の抑制と、自己免疫応答によつて生じる末梢性骨炎の場合同時に免疫抑制活性による、進行性骨不全の付加的治療剤としての特許請求の範囲第1項から第9項までのいずれかに記載の医薬組成物
- (11) すべての型および段階の骨軟化症治療用の特許請求の範囲第1項記載の医薬組成物
- (12) IPN-r 単独またはジリン酸塩と配合したバージエット骨治療用の特許請求の範囲第1項記載の医薬組成物

03 リウマチ型の疾患、とくに慢性関節リウマチ（一次性慢性多発関節）の治療用の特許請求の範囲第1項記載の医薬組成物

04 骨折失が増大する組み上げ構成物の治療用の特許請求の範囲第1項記載の医薬組成物

05 プロスタグランジン合成阻害（活性阻害）における過カルシウム血症の治療用の特許請求の範囲第1項記載の医薬組成物

06 骨疾患の治療に付し活性化せず公知物質を配合した特許請求の範囲第1項から第15項までのいずれかに記載の医薬組成物

3. 症状の詳細な説明

生きている骨組織は一定の再構築過程をくり返していて、生理的条件下には骨形成と分解が平衡を維持している。骨化骨の新形成（骨生成）は主として骨芽細胞の活性によって決定される。これらの骨芽細胞の機能は、骨マトリックスの構成因子——主として collagen 一の合成分と分離であつて、これはついでヒドロキシルアバタイトの結晶によって活性化される。骨化骨の分離

高齢者に多くなるが、この喪失が年齢から考えられるよりはるかに大きいものである。骨粗鬆症はもつとも加齢の場の骨疾患と考えられる。

とくに男性の成人にこの疾患が多い。たとえば本國における調査では 65 歳を超えた全女性の 25 % はこの疾患に罹患しているといふ⁵⁾。調査に計算して、西ドイツでは患者は約 300 ～ 400 万人と考えられる。骨壊失の結果、骨柱、大脳骨頭部または四肢、すなわちとくに大きな应力がかかりやすい身体部位の骨折が増大する。これらの骨折は直症で、運動制限や跛行が現ることが多い。代表的な変化は骨の骨化である。これは患者の運動能を著しく阻害する。常に痛みがあるのに加えて、屈曲した姿勢は、心臓および腎臓等にも悪影響を与える。

この疾患には、カルシウムレベル、およびカルシウムレベルしたがつて骨の変化や有機骨マトリックスの新形成をも調節する各種ホルモンがとくに関与している。女性の成人で低下するエストロジエンはとくに重要である。

は、多分、主に（マクロファージ）から細胞膜酵素によって形成される多核粗大細胞のような破骨細胞によつて行われる¹¹⁾。

骨芽細胞と破骨細胞の活性は、生成過程と分別過程の間の幼細胞を維持する自律性調節機構により、生理的条件下にはたがいに制御されている。細胞はホルモン如く、1,25-ジヒドロキシビタミン D₃、パラシルモンおよび（多分）カルシトニン¹²⁾によつて行われるのみでなく、各種の局所メタボリーゼーおよび組織ホルモン如く、とくにプロスタグランジン¹³⁾やまだ同定されていない“カルボリング因子”¹⁴⁾によつても行われている。最後に挙げた因子は、破骨細胞活性剤如く骨芽細胞の反応性大反応がみられ、これがたとえば分解の増大が骨形成の抑制によつて補償される結果と考えられるといふことで支持されているものである。この平衡の失調が多くの骨疾患の原因となるとくにそのひとつとして骨粗鬆症を挙げることができる。これは骨失が、すなわち骨質量と有機骨マトリックスの喪失を生じるので、主として

各ホルモンおよびメタボリーゼーの特異的活性に関するには、パラシルモンおよびビタミン D₃、とくにその代謝物で骨強度が形成される 1,25-ジヒドロキシビタミン¹⁵⁾が一次的に骨芽細胞の活性を調節することが確立されている¹⁵⁾。さらには、骨球様プレカーネーの融合を促進し、したがつて骨細胞における破骨細胞数を増加させるようと思われる¹⁶⁾。それらの活性に対する直接的な影響も否定できない。プロスタグランジンも別の機序によつて、破骨細胞の数および活性の増加をもたらすとされている¹⁷⁾。

歴史になつて、インターロイキンおよびリンフォカインがまた、骨再構築過程に特異的な抑制を来たしていることが明らかにされた¹⁸⁾。マクロファージの活性亢進の骨組織内で形成されるインターロイキン 1 は骨細胞において骨の分解を促進するが¹⁹⁾、その活性の一郎は骨軟化活性を有するプロスタグランジンの内因性合成分を制御することによると考えられる²⁰⁾。いわゆる“破骨細胞活性化因子”(OAF) は、インターロイキン 1 を含めた各

骨形成に対する影響として、リンパ球によつて產生されるリンフォカインである。DAFはまた、プロスタグランジンによつて产生される骨吸化活性を有する。

骨形成症の治療は、現在では、骨吸收の喪失を回復することが事实上不可能なので難しい。フルオライドによる骨形成については論争がある。したがつて、治療の方向は、骨の分解過程を抑制せば骨の産生まで低下させ、疾患の進行を阻止することに向ければいる。

しかしながら、疾患の予防も必要である。米国では、女性は最初からカルシウムを十分摂取前からさえ、摂取するよう指導されている。

しばらく前から、ペプチドホルモンであるカルシトニンも、骨形成を阻害できるといわれてきた。これに、既往細胞に対するパラシルモンの作用を加えずか。またそれ自身、破骨細胞に対する抑制作用をもつようと思われる。しかしながら、カルシトニンによる治療は少からず、骨の喪失が止まらかに進行していいる患者にのみ推奨されて

を活性化できる(上記文献参照)。

ア-インターフエロンは、既往細胞によつてもたらされる骨吸化活性の分離を促進することが期待されていたのである。したがつて、骨吸化阻害に対する阻害作用は、全く高くべきことである。

本発明は、骨形成および分離の際に生じる過程に対する調節作用をもつ医薬組成物の製造のためのア-IPNの利用に関する。

本発明は、病理的な骨喪失を導く過程を、高くべきことにIPN-Tが阻害できることをはじめて示すものである。これは、プロスタグランジンシテターゼ複合体(シクロオキシゲナーゼ系)とア-インターフエロンの相互作用により、骨における骨吸化活性プロスタグランジン類の内因性合成を一次的に抑制することにより達成される。カルシトニンにはこの作用はない。

骨におけるプロスタグランジンの合成の阻害には、高くべきことに、IPN-Tは特異的な作用である。このような作用はIPN-Tにもメビキノンもカルシトニンに類似の第二の作用(7)に、パラシルモ

ン、さらにも、カルシトニンの様な生体が反応するのは一時期のみで(エスケープ現象)、組られた期間のみ活性を行なうのがよいようと思われる。

したがつて、本発明の目的は、骨喪失によつて生じる骨吸化活性の治療用剤を提供することである。

本発明は、高くべきことに、ア-インターフエロンが、骨形成および分離の際に生じる過程に対するきわめて強力な調節作用を行なうことを発見し、完成されたものである。

免疫インターフエロンとも呼ばれるア-インターフエロン(IPN-T)は、インターロイキン1と同様、リンパ球が予め感染された状況によつて特異的にまたは非特異的に刺激されたら、リンパ球上に生成されるので、1種のリンフォカインとみなすことができる。ヒト免疫球蛋白液中でIPN-Tは多能性細胞(多能性細胞)の生成を促進するので、IPN-Tは抗体産生中等度の細胞を促進できるものと推測された。さらに、IPN-Tは、それ自身、骨軟化活性を発現するマクロファージ

によって刺激される破骨細胞活性の阻害がある。しかしながら、このIPN-Tの作用は病変部の活性化のみ認められる。このカルシトニン様活性は、S100とHcbl100がたとえば、ヒト白血球インターフエロンが蛋白質濃度においてPTH・誘導骨吸収を阻害できることを明らかにしていることから、他の型のインターフエロンにも同様に認められるものであろうと思われる。

ア-インターフエロンによるプロスタグランジン合成の阻害は、これまでインターフエロンはプロスタグランジンの合成を利害するうとする方が考えらかたことからも、全く高くべきことである。たとえば、ヒトア-インターフエロンによる治療中に起こる発熱は、現下部におけるPGE₂濃度の上昇に由来するとされていることなどがである。

この骨吸化に対するア-インターフエロンの高くべき作用は、そのシクロオキシゲナーゼ系に対する特異性によつて説明されるものと想われる。プロスタグランジンシテターゼ複合体の阻害特

異性の差については古くから知られている。竹では、この研究報告は IPN-βや IPN-γでは感作を受けないようである。すでに述べられている結果（たとえば 4）とは別に、上記の JIERS 和 Hamilton の研究例で、インターフエロンは筋膜骨吸収に向むき効果を与えたかつたという事実によつても、これが示されているようと思われる。詳しき場合はの感受性の差を示す他の例は、C-243 細胞からのマウスインターフエロンがマウスでの局所性骨移植に与える影響を検討した KILLEBURN の実験にも認められる。使用したインターフエロンが骨あるいは軟組織下品のアロスタグランジン合成就到達したとしたら期待されるよう、このインターフエロンによる骨軟化症の所見は得られていない。

本発明の他の目的は、病理学的変化した局所性または全身性の骨分離によつて生じる疾患、たとえばすべての骨および皮膚における骨粗鬆症の治療のための活性物質としてア-インターフエロンを含有する医薬組成物の使用にある。

骨症で多くの疾患で良い効果を示しているかということを思い起こせば、骨粗鬆症の治療にとくに有利であろうと思われる。しかしながら、すでに述べたように、カルシトニンは PG の合成に作用せず、その活性の度合は異なるものである。

これらの点から、各症例ごとに、2つの物質のいずれが有利に使用されるか、また両者とも使用できるかを決定できる可能性が生じる。

IPN-αによるアロスタグランジン合成就の驚くべき効果は、骨再構築過程において、IPN-αがインターロイキン1や破骨細胞活性化因子 (OAF) の对抗物であることを示している。この性質は、その合成が各種の炎症メディエーターにより、リウマチ型疾患とくに慢性関節リウマチや類似の疾患において少なからず OAF によって制御されているアロスタグランジンの骨軟化症性が、これらの疾患において認められる骨筋の破壊に寄与していることから、治療的にきかめて重要である。したがつて、本発明は、本発明の医薬のリウマチ型の疾患とくに慢性関節リウマチへの使用をも包含する、

老人性骨粗鬆症の原因および発病に関するところとんどわかつていなか、分解過程の比活性の低めが骨疾患の病理学的変化を招くという考え方¹⁵⁾が広く受け入れられている。骨粗鬆症の患者が、骨吸収ホルモン PTH や 1,25-ジヒドロカルシルの血清レベルに向むき度を示していないという事実は驚くべきことである。したがつて、骨分解速度の増大は一次的に局所性因子の影響に由来するものと推測される。これを支持するものとしては、老人性骨粗鬆症の患者の骨生出で、正常人よりも高い PTH₁₋₈₄ 活性を認めたという ASIKI¹⁶⁾らの研究がある。Fujikura¹⁷⁾らは、骨粗鬆症の患者でア-ヘルバーリンバ球とア-サブレツサーリンバ球の比が変化していることを見出し、骨粗鬆症には先端調節の障害の可能性があると結論した。これは、先端調節因子であるインターロイキン1や上記の破骨細胞活性化因子が PG 合成の調節因子である点で底堅である。またむけた PG 合成に対する IPN-α の驚くべき阻害作用は、IPN-α がカルシトニンと同様に骨吸収に寄与し、このホルモンが過度骨粗

IPN-α による治療は、非ステロイド性の抗炎症剤（たとえばインドメタシン）による相当する効果に比べてきわめて有利である。それは患者が他の治療においても（たとえば骨軟化症においても）同時に PG 合成の阻害作用を示すために底堅な副作用（急性胃腸）を生じるからである。しかしながら、多くの非ステロイド性消炎剤は PG の合成に対してわずかな阻害作用を示すのみであり、これらは、ア-IPN の骨における PG 合成に対する選択性的作用によりア-IPN と有利に配合できることが証明できる。いずれにしても、インターフエロン治療が一次性慢性的多関節炎（慢性関節リウマチ）の治療に何による効果を示すかを判定することは益しい。この疾患では各種の自己免疫現象が認められ、IPN-α の先端調節作用がそのどれに効果を示すかは十分研究されていないからである。使用する用法により、IPN-α はア-リシンバ球による先端グロブリンの産生に抑制作用と制御作用の両者を示す。各々先端疾患において、患者の血清中インターフエロンが増加していることも極めてあ

る、しかしながら、これらの IFN 活性は IFN- α よりもむしろ IFN- β の変化に加すべきものと思われる。細胞によつて与えられる免疫に関するでは、一般に IFN- α は T-リシンパ球の増殖に対する抑制作用を示し、細胞性免疫の現象たとえば移植における拒否反応または腫瘍型の過敏反応は抑制し、これらは PCP の治療には有利であろうと思われる。一方、IFN- α はある種の条件下には細胞の免疫活性を刺激することもある。

すでに知られている細胞生産の抑制能に加えて、骨におけるプロスタグランジン合成の IFN- α による抑制能は、細胞自体がプロスタグランジンを産生し、骨におけるプロスタグランジン合城を抑制するのである。骨への細胞や骨の分解の原因となる細胞の活性にはいずれにしても有利であろうと思われる。

骨の形成および分解の際に起こる過敏に対する明らかにされたア-インターフェロンの効果は、骨形成の活性や骨吸收の増大によつて生じると考えられる炎症性または非炎症性起源（炎症疾患）

その他の活性能様による付加的活性を有するので、カルシトニンまたは他の骨疾患治療として知られている他の薬剤と配合することも可能である。

本発明の薬剤は、たとえば、若年者にもしばしば見られ、一般には皮膚腫瘍とも呼ばれている皮膚の骨吸收のような、骨喪失が進む細胞および骨疾患の治療にもきわめて適している。

本発明の薬剤は、ヒト患者または動物に全身的にまたは局所的に、たとえば頭頸内に投与できるが、一般的には、経口、局所、非経口およびパルカル投与される。理論的には、ア-インターフェロンの血漿/組織レベルの増大をもたらすすべての経口の投与が適している。たとえば、ア-IPN の投与には溶液が便利であるが、他の剤型とすることも可能である。

本発明による利用には、減くべきことに、少量のア-IPN でも十分である。投与量および用量比は、現在、臨床成績でア-IPN に適用されている量と同様である。投与量は投与部位によつて変動する。

投与量は、ア-インターフェロンの血漿/組織

の全身性または局所性骨疾患の治療に使用される医薬組成物のきわめて活性な細胞としてア-インターフェロンを位置づけることになつたのである。

これらの疾患には、すでに述べたものほか、パラソルモンによつて生じる各種の骨異常症、とくに骨性の骨疾患が包含される。進行性骨不全においてパラソルモンによつて生じる骨吸收が知られている。これらの疾患の中には、自己免疫系によつて起こる多発性骨炎がある。とくにこれらの症例には、ア-IPN は免疫抑制作用とともに治療活性物質として、とくに適している。本発明の物質は、骨吸收を阻害し、自己免疫反応に効果的に影響を与える。

同様に、他の骨異常症、バージエット病も、本発明の薬剤で治療できる。

さらに、ア-IPN は、カルシトニン治療過敏で応答がなかつた症例および/または免疫反応を生じた症例すべてに適当に使用できるこという利点がある。

本発明の薬剤、ア-IPN はすでに述べたように、

レベルの効果的な上昇を達成できるようになるとべきことが条件となる。

本発明の薬剤は、慣用の医薬用賦形剤および/またはピークルおよび/または安定化剤を含有させることができる。

使用できる安定化剤の例としては、アミノ酸、ジー、トリシおよびテトラペプチド、既知またはアルブミンを挙げることができる。

本発明の技術分野における熟練者には、多くの賦形剤、ピークルおよび安定化剤がよく知られたところであろうし、また、本発明の薬剤をそれらといかに処方するかも熟知するところであろう。これらに関しては、E. A. Martin 著の Remington's Pharmaceutical Sciences の物質および処方の記載を参照されたい。

次に、本発明を以下の実施例によりさらに詳細に説明するが、これは本発明を例示するためのものであつて、いかなる意味でも本発明を限定するものではない。モデルで得られた結果は、すべての哺乳類動物にましかえることができる。

菌糞および方法

出典えマウス IPN-7 (大腸菌より) (Ernst Boehringer Institute fur Arzneimittelforschung, Vienna) の比活性は 1 mgあたり 1.3×10^7 倍ウイルス単位であつた。IPN-7 は RPMI メジウムに溶解し、使用時まで高濃度低温での凍結状態に保存した。IPN-7 および (ニューキヤツスル特ウイルスで誘発し、テオフィリンで薬誘発した Ehrlich 腹水細胞より) は Endo Biochem, Inc. 社 (U. S.) の製品であつた (Ernst Boehringer Institute fur Arzneimittelforschung)。バツナム 3-07001 の比活性は 4.4×10^6 U/mg 蛋白質であつた。使用した培養の活性は 6.0000 単位/mg と測定された。比較の目的で使用した合成サケカルシトニン (比活性 100 MRC 単位/mg) は Sanabio 社 (Vienna) の製品であつた。バテンルモン社 Bachem 社 (Torrance, California) の合成リ末濃縮片 1-34 を使用した。プロスタグランジン E₂ は Upjohn 社の prostaglandin E₂ という名前で製品を使用した。ウシトロンビンは Hoffman

活性した 15 ml ウマ血清を加えた。ウマ血清 (Gibco) は 65°C で 45 分間不活性化した。完全メジウムを放菌器斗 (0.22 ミクロン, Millipore) を通した後過した。

24 時間後、培養メジウムを各種添加物とともに変え、ついで計 72 時間までまたは最高 96 時間まで培養を続けた。

骨吸収の程度はメジウム中へのカルシウムの放出を測定して定量した。この目的で、培養メジウム中のカルシウム濃度を、Corning 940 カルシウム分析装置で螢光滴定法を用い、時間 0, 24, 48, 72 または 96 に測定した。

結果は 6 例の強度骨での平均士平均の標準誤差で示す。各群間の有意差は Student の t-検定で求め、P < 0.05 をもつて有意とした。

例 1強度骨吸収に対する IPN-7 の影響

メジウムに何も添加物を加えないで骨を培養しても、メジウム中のカルシウム濃度はわずかに増加し、これから骨はたえず吸収されていることが

LaRoche 社の topostatin や、またインドメタシンは Sharp & Dohme 社の製品をそれぞれ使用した。

マウス新生仔の頭蓋骨は、無器用費でかなり長期間 (96 時間までまたはそれ以上) 保持できる。実験法の詳細については多くの研究者が報告している (8, 12, 13)。使用した特定のマウスは、4-6 日齢の SPF マウスであつた (Institute fur Versuchstierzucht of Vienna University, Hinterberg)。この種は、HIM : OF と表示する。

頭蓋骨は滅菌条件下に調製する (ラミナーフロー)。付着した結合組織を注意深く除去したのち、骨を試験管中 1.0 ml の培養メジウム (下記組成) 内に移す。50% O₂, 45% N₂ および 5% CO₂ で処理したのち、試験管を密封し、ついで無器用費の全期間を通じ、回転ドラム中 (回転速度: 2.0 回転/時)、37°C でインキュベートする。

培養メジウムは、MA Bioproducts 社 (Walkerville, Md) 製のダルベッコ改良イーグルメジウム (DMEM) とした。このメジウムに L-グルタミン酸を 1.4% の濃度に加え、また加熱して不活性化した。

わかる (第 1 図参照)。この理由はプロスタグランジンの内因性生成にある (14, 15)。つまり、この基礎吸収は、第 1 図から明らかなように、プロスタグランジン合成の強力な阻害剤であるインドメタシンによって抑制することができる。

培養メジウムに 100 U/mg の濃度の IPN-7 を加えても、カルシトニンの阻害作用の程度に相当し、またインドメタシンの抑制効果に匹敵する基礎吸収の阻害が認められる (第 1 図)。結果を第 1 表にまとめる。

第1表

		メジカム44 (a ⁺⁺) mmol/l (5%の牛の平均血漿濃度)		
試験時間	48h	24h	48h	72h
非処置		1.40 ± 0.06	2.02 ± 0.07	1.86 ± 0.09
uCT (salmon calcitonin) (20 MU/ml)		1.64 ± 0.02	1.70 ± 0.02	1.65 ± 0.03
Indometacin (5 × 10 ⁻⁷ M)		1.63 ± 0.01	1.61 ± 0.02	1.55 ± 0.06
IPN-T (100 U/ml)		1.80 ± 0.05	1.69 ± 0.02	1.52 ± 0.04

れる。トロンビンの活性の正確な機構はわかつてゐないが、その蛋白分解活性（多分、他のプロテアーゼの活性化）により、複数ホスホリビドからアラキドン酸を切り離すホスホリバーゼを活性化できることによると推測されている。その結果、シクロオキシゲナーゼ系の蓄積がたえず供給されることになり、各種プロスタグランジンの内因性合説がたえず刺激されやすい。第2表および第2図は、IPN-Tがトロンビン誘発骨吸収を完全に抑制することを示している。先端インテラーフェロンの作用は、インドメタシン 5×10^{-7} Mの作用効力に全く匹敵するものである。

72時間試験では、用量-活性曲線の挿入時の作成を使用した。

第2

トロンビン誘発骨吸収に対するIPN-Tの効果

また、本発明者らは、培養骨中の内因性プロスタグランジン産生にIPN-Tが阻害を示すかどうかを明らかにすることを試みた。そのためには試験方法を開発した。すなはち、培養メジカムにトロンビンを加えると、インドメタシンによって阻害される骨吸収が増強され、トロンビンは明らかに内因性PG合説を刺激するという現象に出発し、72時間の培養時間中ににおけるマックス培養骨の吸収に対する種々の濃度のトロンビンの影響を検討した。第2表と第8図から明らかのように、培養メジカム1mlあたり14-42単位の濃度のトロンビン濃度でカルシウムのメジカム中への最高放出が起こり、トロンビンによる吸収過程の刺激の程度は各試験間で比較的わずかな変動を示すのみでなく、各試験の比較で測定されたカルシウム放出の絶対値には高い再現性があることがわかつた。したがつて、この試験は骨にかけた20合説の阻害剤の影響をみるのにとくに適していると考えら

第2表

		メジカム44 (a ⁺⁺) mmol/l (5%の牛の平均血漿濃度)		
試験時間	24h	48h	72h	
トロンビン バイオアッセイ				
非処置	1.66 ± 0.03	1.63 ± 0.07	1.61 ± 0.07	
Thrombin 1 U/ml	1.67 ± 0.03	1.81 ± 0.09	2.01 ± 0.31	
Thrombin 7 U/ml	1.81 ± 0.06	2.30 ± 0.11	3.02 ± 0.55	
Thrombin 14 U/ml	2.13 ± 0.08	2.66 ± 0.11	3.56 ± 0.21	
Thrombin 21 U/ml	2.21 ± 0.03	2.69 ± 0.05	3.63 ± 0.11	
Thrombin 28 U/ml	2.28 ± 0.02	2.71 ± 0.06	3.61 ± 0.12	
Thrombin 42 U/ml	2.30 ± 0.05	2.72 ± 0.10	3.52 ± 0.12	

図3

試験時間	マジカルム中 Ca^{++} (mmol/L)		
	24h	48h	72h
非処置	1.72 ± 0.03	1.71 ± 0.02	1.63 ± 0.04
IPN-T (100 U/ml)	1.60 ± 0.01	1.59 ± 0.02	1.52 ± 0.04
POE ₂ (5 × 10 ⁻⁷ M)	2.04 ± 0.03	2.60 ± 0.05	3.60 ± 0.13
IPN-T (100 U/ml)	1.95 ± 0.04	2.40 ± 0.01	3.10 ± 0.06
Thrombin (14 U/ml)	2.11 ± 0.07	2.62 ± 0.05	3.62 ± 0.06
Thrombin (14 U/ml) + IPN-T (100 U/ml)	1.99 ± 0.05	2.01 ± 0.04	1.92 ± 0.06
Arachidonic acid (5 × 10 ⁻³ M)	1.92 ± 0.05	2.35 ± 0.10	2.85 ± 0.27
Arachidonic acid (5 × 10 ⁻³ M) + IPN-T (100 U/ml)	1.92 ± 0.09	2.01 ± 0.05	1.93 ± 0.03

活性投与でも、またアラキドン酸投与投与後投与でも有意な影響を与えないことと注目すべきである
(図3図、図4図、図4及、図5実験結果)。

893

POシンターゼ複合体に対するIPN-Tの影響

まず、本発明者らは、IPN-Tがトロンボン活性の他のプロテアーゼもしくはホスホリバーゼの活性化に影響するかどうか、または免疫インターフェロンが直鎖プロスタグランジンシンターゼ複合体と相互作用するかどうかを確立することを試みた。この目的で、培養骨中のプロスタグランジン合成を培養メジウムへのアラキドン酸添加によって制御した。この脂肪酸は前述のように、シクロオキシゲナーゼ反応により様々なプロスタグランジンに変換される。その骨軟化活性(第2回)から、培養骨中でもプロスタグランジンの合成に内因性アラキドン酸が使われるることは明らかである。IPN-Tは、アラキドン酸によって制御された脂肪酸活性中での骨軟化活性を完全に遮蔽でき(第2回)。これらの結果は、IPN-Tが骨中のプロスタグランジンシンターゼ複合体に直接作用できることを示している。

これに因連して、カルシトニンはトロンボン

図4

試験時間	マジカルム中 Ca^{++} (mmol/L)		
	24h	48h	72h
非処置	1.74 ± 0.04	1.72 ± 0.05	1.64 ± 0.08
Thrombin (14 U/ml)	2.11 ± 0.07	2.62 ± 0.05	3.62 ± 0.06
Thrombin + scv (20 mg/ml)	1.82 ± 0.01	2.08 ± 0.08	2.82 ± 0.19
Thrombin (14 U/ml) + IPN-T (100 U/ml)	1.93 ± 0.03	2.01 ± 0.04	1.92 ± 0.06

メジカム中 Ca^{2+} (mmol/l)

(5皿の骨の半端骨吸収量)

試験物	24h	48h	72h
非処置	1.78 ± 0.03	2.01 ± 0.04	1.85 ± 0.04
AA ($5 \times 10^{-4} \mu\text{M}$) ⁺	1.95 ± 0.03	2.41 ± 0.11	2.96 ± 0.28
ACT ($20 \mu\text{U}/\text{ml}$)	1.72 ± 0.02	2.13 ± 0.05	2.78 ± 0.20
ACT ($20 \mu\text{U}/\text{ml}$)	1.64 ± 0.02	2.18 ± 0.06	1.65 ± 0.03

する作用力にかかる。PTH 誘発骨吸収に対するカルシトニンの作用を示すことが明らかにされた。ナトリウムカルシトニン $2.0 \mu\text{U}/\text{ml}$ の PTH 活性に対する作用を比較のため示す。

昭和昭62-12724 (8)

図 4

POE₂ および PTH によって制限された骨吸収に対する IPN-T の影響

IPN-T がプロスタグランジンの合成を抑制する事が確立されたので、培養メジカム中に加えた POE₂ の骨吸収活性に対する IPN-T の影響は薄いものであろうと予測された。実際、第 2 図に示すように、IPN-T は POE₂ の骨吸収活性にはわずかな影響を与えるのみであった。しかしながら、この阻害作用は、内因性プロスタグランジン合成によってもたらされる基礎骨吸収の相当する抑制より大きかつたことは注目に値する。プロスタグランジン合成の阻害に加えて、IPN-T がプロスタグランジンの一貫した作用に影響しないかをみるために検討を行つた。これらの作用にはとくに破骨細胞の活性化が含まれる(16)。

バランソルモント、プロスタグランジンとは独立の機構で、無酸素培養時骨吸収細胞の数および活性を増大させる(7)。試験結果を第 5 表に示す。図に示す。IPN-T は、プロスタグランジン合成に対する

図 6

メジカム中 Ca^{2+} (mmol/l)

(5皿の骨の半端骨吸収量)

試験物	24h	48h	72h	96h
非処置	1.85 ± 0.02	2.04 ± 0.04	2.06 ± 0.06	2.05 ± 0.06
IPN-T ($500 \mu\text{U}/\text{ml}$)	1.89 ± 0.03	1.89 ± 0.04	1.84 ± 0.03	1.78 ± 0.03
PTH ($10^{-4} \mu\text{M}$) ⁺	2.08 ± 0.05	2.75 ± 0.07	3.84 ± 0.06	4.51 ± 0.16
PTH ($10^{-4} \mu\text{M}$) ⁺ IPN-T ($100 \mu\text{U}/\text{ml}$)	2.07 ± 0.02	2.55 ± 0.06	3.49 ± 0.11	3.82 ± 0.17
PTH ($10^{-4} \mu\text{M}$) ⁺ IPN-T ($250 \mu\text{U}/\text{ml}$)	2.05 ± 0.04	2.39 ± 0.07	3.12 ± 0.16	3.40 ± 0.25
PTH ($10^{-4} \mu\text{M}$) ⁺ IPN-T ($500 \mu\text{U}/\text{ml}$)	2.08 ± 0.05	2.36 ± 0.01	2.94 ± 0.05	3.19 ± 0.09
PTH ($10^{-4} \mu\text{M}$) ⁺ ACT ($20 \mu\text{U}/\text{ml}$)	1.65 ± 0.01	2.15 ± 0.05	2.45 ± 0.10	2.52 ± 0.13

図5

筋膜とエビ刺激収収に対する IPN- α , β の影響
アラキドン酸エビ刺激に対する作用がとくに
IPN- α に特異的なものか、または他の型のインタ-
ーフェロンにも認められるものかを確立するため
に、一連の試験を行、 α -インターフェロン
(IPN- α , β)についても反復して実施した。第6
図に示すように、この型のインターフェロンは、
IPN- β とは異なり、トロンビンまたはアラキドン
酸脂質収収に対し、みるべき影響を示さない。
用いた濃度 (100 U/ μ メジクム) では、PTH
脂質収収に対する IPN- α , β の阻害も認められ
なかつた(第7図)。結果は以下の2表に示す。

表8

試験回数	24h			48h			72h			96h		
	IPN α / β (100 U/ μ ml)	IPN α / β (100 U/ μ ml)	PTH (10 $^{-4}$ U) + IPN α / β (100 U/ μ ml)	IPN α / β (100 U/ μ ml)	PTH (10 $^{-4}$ U) + IPN α / β (100 U/ μ ml)	IPN α / β (100 U/ μ ml)	IPN α / β (100 U/ μ ml)	PTH (10 $^{-4}$ U) + IPN α / β (100 U/ μ ml)	IPN α / β (100 U/ μ ml)	PTH (10 $^{-4}$ U) + IPN α / β (100 U/ μ ml)	IPN α / β (100 U/ μ ml)	
	1.85±0.03	2.02±0.04	2.04±0.08	2.01±0.08	1.98±0.10	1.98±0.12	1.92±0.12	1.92±0.12	1.92±0.12	1.92±0.12	1.92±0.12	1.92±0.12

表7

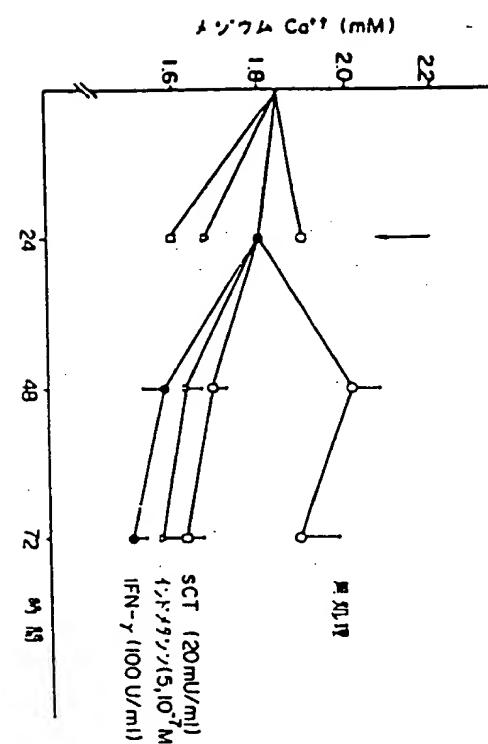
アラキドン酸 α -カルシウム収収に対する IPN- α , β の影響 (5匹のラットの平均±標準偏差)				
試験回数	24h	48h	72h	
添加物				
非処置	1.85±0.03	2.02±0.04	2.09±0.08	2.01±0.08
IPN α / β (100 U/ μ ml)	1.88±0.08	2.02±0.10	1.98±0.12	1.92±0.12
POE ₂ (5×10 $^{-7}$ U)	2.04±0.04	2.78±0.09	2.44±0.08	3.13±0.19
POE ₂ (5×10 $^{-7}$ U) + IPN α / β (100 U/ μ ml)	1.97±0.06	2.64±0.11	3.62±0.23	4.14±0.27
Thrombin (14 U/ μ ml)	1.96±0.05	2.58±0.06	2.96±0.11	3.49±0.16
Thrombin (14 U/ μ ml) + IPN α / β (100 U/ μ ml)	2.08±0.04	2.50±0.01	3.20±0.06	3.81±0.08
AA (5×10 $^{-7}$ U)	2.07±0.05	2.50±0.08	3.15±0.16	3.39±0.27
AA (5×10 $^{-7}$ U) + IPN α / β (100 U/ μ ml)	2.03±0.04	2.46±0.07	2.84±0.11	2.89±0.22

4. 図面の簡単な説明

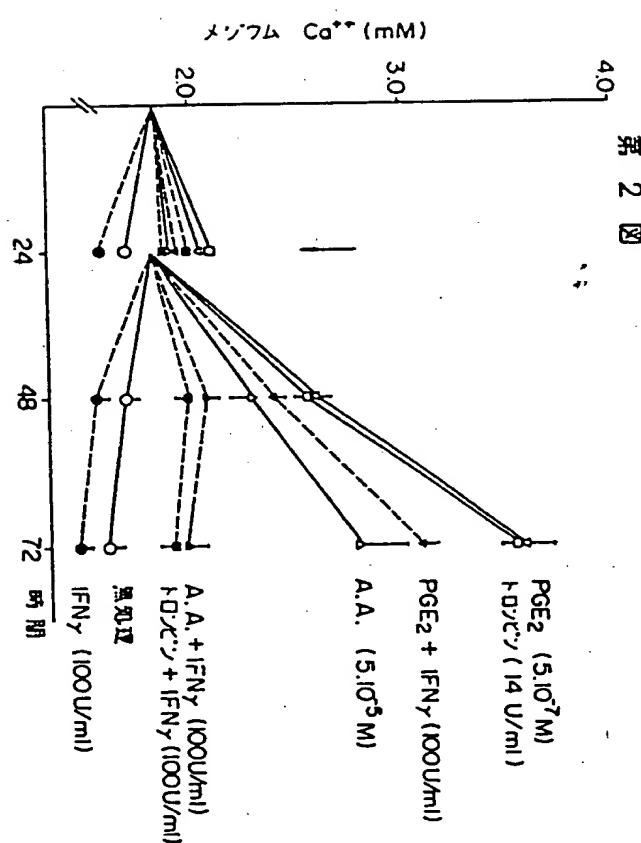
第1図は、マウス新生仔由来骨からリカルシウム放出 (筋膜骨収収) に対する IPN- β の影響を示す。第2図は、POE₂、トロンビンまたはアラキドン酸 (AA) によって刺激された骨収収に対する IPN- β の影響を示す。第3図は、培養マウス新生仔頭蓋骨のトロンビン脂質骨収収に対するサケカルシトニン (SCT) の影響を示す。第4図は、アラキドン酸 (AA) 脂質骨収収に対するサケカルシトニン (SCT) の影響を示す。第5図は、培養マウス由来骨のパラソルモン (PTH) 脂質骨収収に対する IPN- α , β の影響を示す。第6図は、培養マウス新生仔頭蓋骨の骨収収に対する IPN- α , β の影響を示す。第7図は、培養マウス新生仔の頭蓋骨におけるパラソルモン (PTH) 脂質骨収収に対する IPN- α , β の影響を示す。第8図はトロンビン・バイオアッサーで、トロンビン脂質骨収収の時間経過と重量倍性曲線を示している。
○：对照； ▲：10 U/ μ ； △：70 U/ μ ； □：
140 U/ μ ； 填入図は培養72時間後の、培養1

シウムへのカルシウム放出で測定した。トロンビン0~420U/mlの用量-活性曲線である。

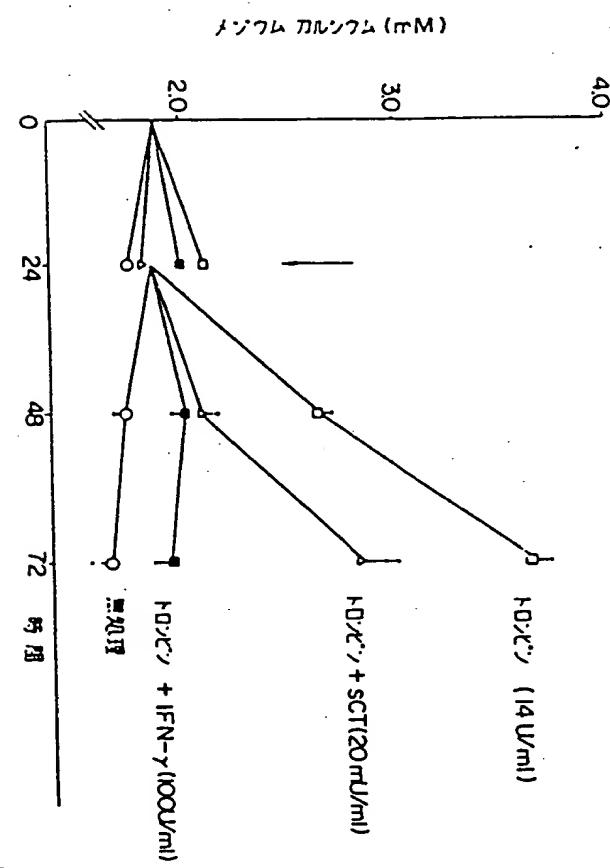
代入活性曲線



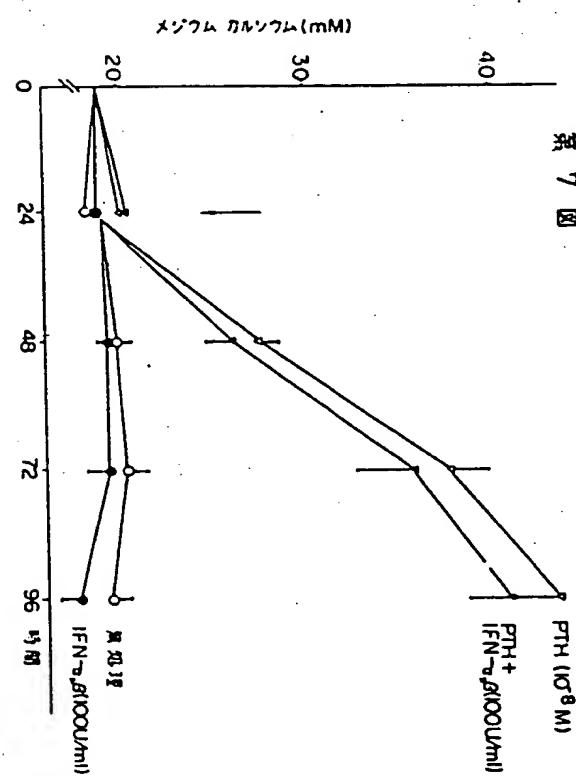
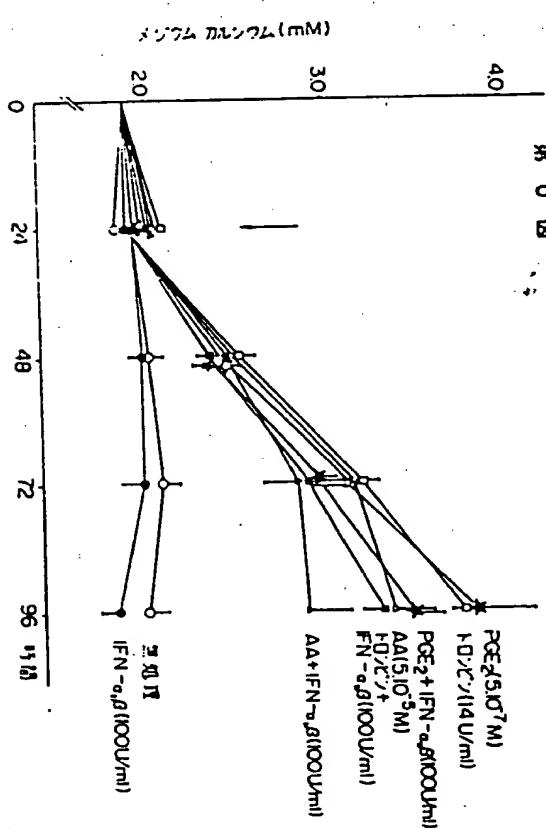
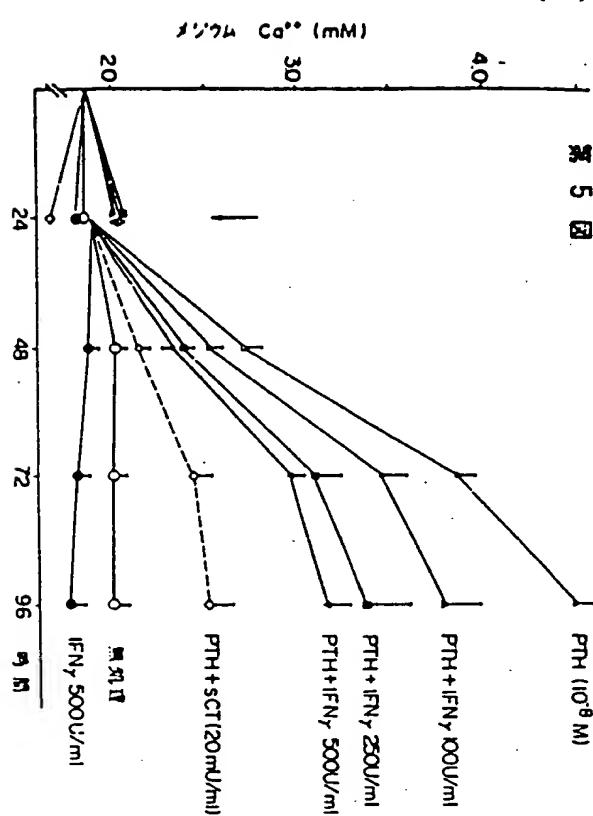
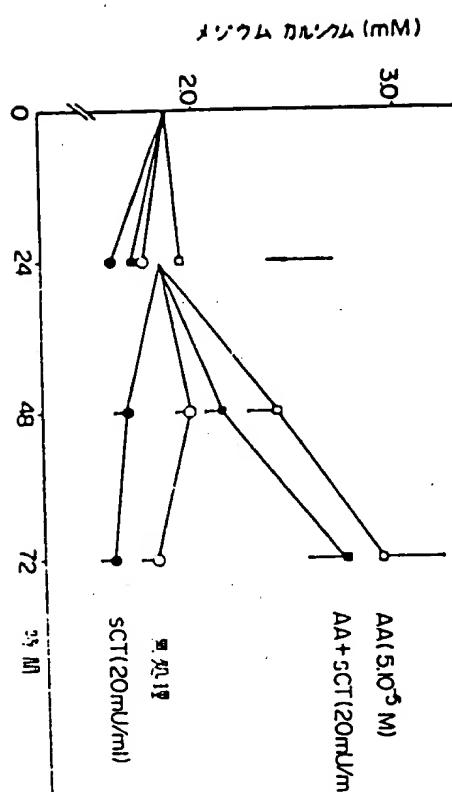
第1図

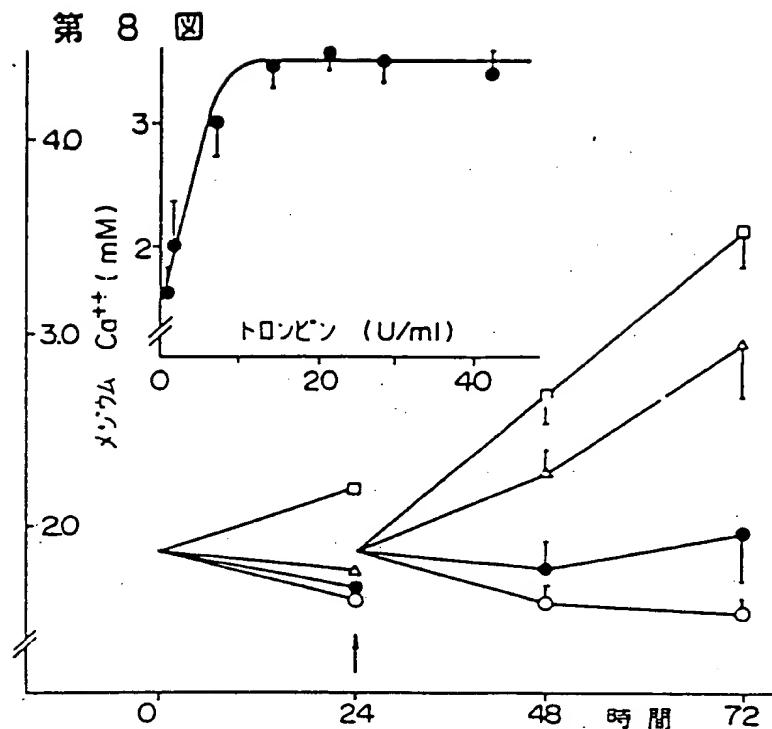


第2図



第3図





手 続 紹 正 書 (方式)

昭和61年 8月11日

特許庁長官殿

1. 事件の表示

昭和61年特許第123862号

2. 発明の名称

I-F-N-T含有医薬組成物

3. 紹正をする者

事件との関係 特許出願人

氏名 ベーリングー インダストライム インターナショナル
 (略称) ダゼルシヤフト ミント ベシュレシクナル
 ハーフング

4. 代理人

住所 〒100 東京都千代田区大手町二丁目2番1号
 新大手町ビルディング331
 電話 (211) 3651 (代表)
 (6669) 渋村 皓



5. 紹正命令の日付

昭和61年 7月29日

6. 紹正により増加する発明の数

7. 紹正の対象

明細書



8. 紹正の内容 別紙のとおり

明細書の争審(内容に変更なし)